

# 시판 까나리(*Ammodytes personatus*) 액젓에서 Putrescine 생성균의 분리 및 특성

엄인선 · 김태옥 · 박권삼\*

군산대학교 식품생명공학과

## Isolation and Characterization of Putrescine-producing Bacteria in Commercially Available Sauces Made from Salted and Fermented Sand Lance *Ammodytes personatus*

In-Seon Um, Tae-Ok Kim and Kwon-Sam Park\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea

Bacterial decarboxylation of amino acids in food leads to the production of biogenic amines, which can cause reactions in human that include headaches, nausea, palpitations, chills, and severe respiratory distress. The amine putrescine is an especially effective inhibitor of metabolizing enzymes and amplifies histamine intoxication and tyramine poisoning. Using an L-ornithine decarboxylating medium, we isolated 14 putrescine-producing bacteria from sand lance, *Ammodytes personatus*, sauces. The isolates were identified, using an API kit and 16S rRNA analysis, as *Lysinibacillus fusiformis* (1 strain), *Lysinibacillus xylanilyticus* (6 strains), *Lysinibacillus macroides* (1 strain), *Lysinibacillus sphaericus* (3 strains), *Bacillus fusiformis* (1 strain), *Paenibacillus favisporus* (1 strain), and *Staphylococcus caprae* (1 strain). These strains produced between 1.66 to 236.97 µg/mL of putrescine after 48 h incubation. *Lysinibacillus* spp. were the dominant putrescine-producing bacteria in sand lance sauces, which produced 236.97 µg/mL of putrescine from a culture broth containing 0.5% L-ornithine. This is the first report on the isolation and identification of putrescine-producing bacteria from sand lance sauces.

Key words: *Ammodytes personatus*, Fish sauces, Biogenic amines, Putrescine-producing bacteria, Identification

### 서 론

우리나라의 대표적인 수산 발효 식품인 액젓은 어류, 갑각류, 연체류, 극피류 등의 전체 또는 일부분을 주원료로 하여 식염을 가하여 발효 숙성한 후 여과하거나 분리한 액 또는 이에 젓갈을 여과하거나 분리하고 남은 것을 재발효 또는 숙성시킨 후 여과하거나 분리한 액을 혼합한 것을 말한다(KMFDS, 2016). 식품공전에 따른 액젓 품질에 관한 규격은 총질소(액젓 1.0% 이상, 조미액젓 0.5% 이상), 대장균군 음성 및 타르색소 불검출로 규정되어 있으며(KMFDS, 2016), 수산전통식품 품목별 품질 기준에는 액젓은 설탕(고유의 색깔을 띠고 변색이 없어야 한다), 향미(고유의 향미를 가지고 이취가 없어야 한다), 혐잡물(토사 및 기타 혐잡물이 없어야 한다), 수분(70% 이하), 염분

(23% 이하), 전질소(1.0% 이상) 등에 관한 규정이 설정되어 있다(NFQS, 2016). 액젓은 어류, 패류 또는 어류의 내장 등에 고농도의 염을 가하여 원료에 존재하는 효소와 미생물 작용으로 발효 및 숙성하기 때문에 독특한 맛과 풍미가 있으나 비위생적인 환경에 노출되면 유해미생물이 증식하여 액젓 발효에 부정적인 영향을 미친다. 발효식품에서 가장 대표적인 화학적 위험요인인 biogenic amines은 단백질을 함유한 식품이 부패하거나 발효과정에서 유리아미노산이 미생물의 탈탄산작용에 의해 생성되는 질소화합물로 화학적 구조에 따라 지방족화합물(putrescine, cadaverine, agmatine, spermine, spermidine), 방향족화합물(tyramine, 2-phenylethylamine), 헤테로고리화합물(histamine, tryptamine)로 나뉜다(ten Brink et al., 1994). Biogenic amines은 체내에서 직·간접적으로 중추신경전달물질로

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0573>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 49(5) 573-581, October 2016

Received 26 August 2016; Revised 29 September 2016; Accepted 30 September 2016

\*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1822 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: parkks@kunsan.ac.kr

작용하고 혈압조절 및 혈류 등의 심혈관에도 영향을 미치며, 다량 섭취하였을 경우 신진대사에 이상이 생기고, 호흡곤란, 홍조와 두통, 메스꺼움, 오한, 설사, 비정상적인 경련 등을 유발한다 (Kim et al., 2012; Biji et al., 2016). 액젓의 biogenic amines 저감화를 위한 연구로는 액젓을 제조할 때 단백질 분해효소 또는 starter를 첨가하여 biogenic amines 생성균의 생육을 저해하는 방법 (Yongsawatdigul et al., 2007; Jeong et al., 2014; Udomsil et al., 2015), 액젓에 chlorine dioxide 첨가하는 방법 (Zaman et al., 2011), 양념류의 에탄올 추출물 첨가에 의한 저해 효과 (Zhou et al., 2016), 어류 가공품의 pH를 4.5 이하로 낮추어 탈탄산 효소 활성의 억제 (Dapkevicius et al., 2000), 또는 감마선 조사에 의한 biogenic amines 생성균의 생육 억제 (Kim et al., 2004) 등의 연구가 진행되었으나 실효성 및 현장 적용에는 문제점이 내포되어 있는 실정이다. 미국은 다랑어 및 mahi-mahi 등의 안전한 섭취를 위해 histamine은 50 mg/kg을 넘지 않도록 규정하고 있으며 (USFDA, 2011), 유럽연합은 신선 어류의 histamine은 200 mg/kg 이하 및 훈제어류제품은 400 mg/kg 이하로 규정하고 있으며 (Yang et al., 2014), 캐나다는 멸치와 발효 소스에 대해 최대 200 mg/kg 이하, 그 외의 어류 및 어류가공품에 대해서는 최대 100 mg/kg 이하로 규정하고 있다 (Health Canada's Maximum Levels for Chemical Contaminants in Foods, 2016). 우리나라는 냉동어류, 염장어류, 통조림, 건조/절단 등 단순 처리한 식품의 경우에는 histamine 함량을 200 mg/kg 이하로 설정되어 있으나 (KMFDS, 2016), 액젓의 경우 biogenic amines에 대한 기준 또는 규격은 설정되어 있지 않아 수산식품위생 및 국민건강을 위해 biogenic amines 관리의 필요성이 꾸준히 제기되고 있다. Biogenic amines의 한 종류인 putrescine은 그 자체로는 독성이 높지 않으나 diamine oxidase와 histamine-N-methyltransferase의 효소작용을 방해하여 histamine과 tyramine을 분해하지 못하게 함으로써 이들 독성을 유지시키며, 식품중의 아질산염을 발암성인 heterocyclic carcinogenic nitrosamine으로 바뀌게 하는 역할에도 관여한다고 보고되어 있다 (Bills et al., 1973; Warthesen et al., 1975; Prester, 2011). 액젓 이외의 다른 발효식품의 경우 biogenic amines 생성균에 관한 연구는 다수 보고되어 있으나 전통수산물 발효 식품인 까나리액젓에서 biogenic amines 생성균에 관한 연구보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 논문은 국내 시판 까나리액젓에서 biogenic amines의 한 종류인 putrescine 생성균을 분리하여 특성을 검토하였기에 putrescine 저감화를 위한 기초자료로 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

실험에 사용한 까나리액젓은 대형마트 및 도매시장에서 판매하고 있는 제품으로 B사(경기 인천), C사(경기 안성), D사(충남

천안), G사(전북 부안), H사(충남 논산), K사(충남 홍성), N사(충남 논산)의 7개 제품을 구입하여 냉장고에 보관하면서 분석에 사용하였다. Putrescine (98%), 1,7-diaminoheptane (I.S.) 및 dansyl chloride는 Sigma-Aldrich (Switzerland) 제품을, acetonitrile은 HPLC 급을 사용하였으며, ether 등은 특급 시약을 사용하였다. 또한 유전자 증폭은 Takara (Japan)사의 Ex Taq polymerase 제품을 사용하였다.

### 시판 까나리액젓에서 putrescine 생성균의 분리

Putrescine 생성균의 분리는 Zaman et al. (2011)의 방법을 약간 변형하였는데 까나리액젓 1 mL를 탈탄산 배지[tryptone (0.5%), yeast extract (0.5%), sodium chloride (3%), glucose (0.1%), tween 80 (0.05%), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.02%), CaCO<sub>3</sub> (0.01%), MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.005%), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.004%), bromocresol purple (0.006%), ornithine (2%) and agar (2%)]에 접종하여 35℃에서 48시간 배양한 후 보라색 환을 띄는 집락은 Luria-Bertani (tryptone 1%, yeast-extract 0.5%, NaCl 3%) broth에 접종하고 35℃에서 하룻밤 진탕 배양 후 멸균된 글리세린을 최종 농도 15%가 되도록 첨가하여 cryovial storage box (Simport, Canada)에 넣어 -80℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 분리 균주의 동정

분리 균주의 동정은 형태학적, 생화학적 및 16S rRNA 염기서열 등을 분석하여 동정하였다. 균주의 형태학적 특징은 그림 1에 표시하였으며 광학현미경(Olympus CX31, Philippines)으로 형태를 관찰하였으며, 생화학적 특성은 API Staph 및 API 50CHB (BioMerieux, France)를 사용하여 조사하였다. 16S rRNA 서열 분석을 위한 genomic DNA 추출은 Genomic DNA extraction kit (Qiagen, USA)를 사용하여 정제하였으며, 16S rRNA 증폭용 primer (Dunbar et al., 2000)는 27F primer (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')와 1492R primer (5'-TACCTTGT-TACGACTT-3')를 사용하였다. PCR 반응액은 0.5 μL (2.5 U) Taq polymerase, 5.0 μL Taq polymerase buffer (× 10), 4.0 μL 2.5 mM dNTP, 35.5 μL 증류수에 20 pmol의 각 primer 2.0 μL와 1.0 μL의 주형 DNA를 첨가하여 총량이 50 μL가 되도록 준비하였다. DNA 증폭을 위한 PCR 반응 조건은 95℃에서 3분간 1회 열 변성 후 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 2분을 한 단위로 하여 이를 30회 반복하여 DNA를 증폭하였으며 유전자 증폭에는 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel (Sigma, USA)에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 목적 DNA의 증폭 여부를 확인하였으며 목적 DNA는 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)으로 정제하여 pT7Blue T Vector (Novagen, USA)에 TA cloning한 다음 *Escherichia coli* DH5α에 형질 전환하였으며 plasmid DNA는 QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, USA)로 정제하여 염기서열을 결정하였

다. DNA 염기서열결정은 ABI310 sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였으며, 유전자 서열은 DNASIS MAX v3.0 program (Hitachi Software, Tokyo, Japan) 및 유전자 상동성은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 검색하였다.

### Putrescine 생성량의 측정

까나리액젓에서 분리한 putrescine 생성균은 LB broth (NaCl 3%)에서 하룻밤 전 배양 후 본 배양 배지[LB broth (NaCl 3%)에 ornithine 0.5% 첨가하고 pH를 5.8으로 맞춘 후 pyridoxal-HCl 0.0005% 첨가] 5 mL에 전 배양액 50  $\mu$ L를 접종하여 35°C에서 진탕하면서 배양 24시간 및 48시간 후의 상층액을 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과하여 배지에 생성된 putrescine 양은 HPLC로 측정하였다. Putrescine 표준 물질은 0.1N HCl에 녹여 최종 농도는 500  $\mu$ g/mL가 되게 하고, 내부표준물질(1,7-diaminoheptane)은 0.1N HCl에 녹여 최종 농도는 100  $\mu$ g/mL가 되게 하여 표준용액으로 사용하였다. Putrescine 생성능 측정은 식품공전의 수산물에 대한 규격(KMFDS, 2016)에 준하여 실시하였는데, 표준 용액 및 시험 용액(배양액) 1 mL를 시험관에 취하고 여기에 내부표준용액 0.1 mL, 포화탄산나트륨용액 0.5 mL와 1% dancyl chloride 용액 0.8 mL를 가하여 충분히 혼합한 후 마개를 하여 45°C에서 1시간 유도체화 하였다. 여기에 10% proline 용액 0.5 mL 및 ether 5 mL를 가하여 10분간 진탕하고 상층액을 취하여 질소 가스로 농축한 뒤 acetonitrile 1 mL를 가하여 녹이고 0.2  $\mu$ m syringe filter로 여과하여 HPLC system (YL 9100, YoungLin Instrument Co., Ltd., Korea)으로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다.

### 효소활성 측정

Putrescine을 생성하는 균주들이 생산하는 효소 및 효소 활성은 API ZYM kit (BioMerieux, France)를 사용하여 측정하였다.

Table 1. Instrument condition for HPLC analysis of putrescine

| Parameter              | Conditions  |                      |
|------------------------|---|----------------------|
| Detector               | UV  |                      |
| Column                 | Carbamate Column C <sub>18</sub> (4.6×250 nm×5 $\mu$ m) |                      |
| Column temp            | 40°C  |                      |
| Flow rate              | 1 mL/min  |                      |
| Run time               | 35 min  |                      |
| Wavelength             | 254 nm  |                      |
| Gradient elution (min) | ACN <sup>1</sup> (%)                                    | H <sub>2</sub> O (%) |
| 0                      | 55  | 45                   |
| 15                     | 65  | 35                   |
| 25                     | 80  | 20                   |
| 35                     | 90  | 10                   |

<sup>1</sup>ACN, acetonitrile.

다. 시험균주는 LB agar (NaCl 3%)에서 하룻밤 배양한 후 균체를 회수하여 PBS (phosphate buffered saline, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)로 현탁하여 Mcfarland 탁도 5-6으로 조정하였다. 조정된 균은 API ZYM kit의 각 cupule에 65  $\mu$ L를 접종하고 37°C에서 4시간 배양하여 색깔 변화로 효소 활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 시판 까나리액젓에서 putrescine 생성균의 분리

이전 연구에서 7종의 국내 시판 까나리액젓을 대상으로 7종의 biogenic amines 함량을 조사한 결과, 가장 함량이 높은 아민은 histamine이였으며 범위는 240.8-410.4 mg/kg (평균 301.02 mg/kg)이었다. 이어 tyramine은 88.26-348.92 mg/kg (평균 199.21 mg/kg)인 것으로 분석되었으며, putrescine은 73.61-500.23 mg/kg (평균 183.00 mg/kg), cadaverine은 10.97-65.67 mg/kg (평균 29.78 mg/kg), tryptamine은 9.42-18.19 mg/kg (평균 13.01 mg/kg), spermidine과 spermine은 모든 시료에서 검출되지 않았다(Um and Park, 2015). 시판 까나리액젓의 biogenic amines 저감화를 위한 방안을 강구하기 위하여 시료에 따라 함량의 차이가 큰 putrescine 생성균의 분리를 시도하였다. Putrescine 생성균은 배지에 전구체인 L-ornithine이 존재하면 amino acid decarboxylase의 작용에 의해 L-ornithine이 putrescine으로 전환되며 이때 배지의 pH가 알칼리성으로 바뀌어 배지에 존재하는 지시약에 의해 colony 주변에는 보라색 또는 자주색 환이 형성된다. 결과적으로 7종의 시판 까나리액젓에서 putrescine 생성균으로 추정되는 14균주를 순수 분리하였으며 -75°C deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 분리 균주의 동정

Putrescine 생성균으로 추정되는 14균주는 형태학적, 생화학적 및 유전학적 방법을 사용하여 동정하였다. 그람 염색 결과, 13균주는 형태학적으로 그람 양성 간균이였으며 나머지 1균주는 그람 양성 구균으로 확인되었다. 그람 양성 간균의 13균주는 API 50CHB kit를 사용하여 생화학적 특성을 검토하였다. 생화학 분석 결과, *Bacillus non-reactive*로 동정되는 4균주(65.7-87.5%의 상동성, 1, 2, 3, 9번 균주), *Brevibacillus non-reactive*로 동정되는 8균주(56.3-81.8%의 상동성, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13번 균주) 및 *Paenibacillus lautus*와 91.5%의 상동성을 나타내는 1균주(7번 균주)로 동정되었다(Table 2). 또한 그람 양성 구균의 형태를 나타내는 1균주에 대한 API Staph kit를 이용한 생화학적 분석결과, 이 균주는 *Staphylococcus caprae*와 94.3%의 상동성을 나타내었다(결과 미제시). *Staphylococcus caprae*는 혈류, 요로, 뼈, 관절 등의 질환에 원인이 되는 병원성 세균으로 보고되어 있으나(Vandenesch et al., 1995; Zheng et al., 2015), biogenic amine 생성 관련 또는 amino acid de-

Table 2. Identification of putrescine producing bacteria

|                                    | Strain No. |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                    | 1          | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13  |
| Gram stain                         | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Morphology                         | rod        | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod | rod |
| Glycerol                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   |
| Erythritol                         | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| D-Arabinose                        | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| L-Arabinose                        | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Ribose                             | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| D-Xylose                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| L-Xylose                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Adonitol                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Methyl-B-D-Xylopyranside           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Galactose                          | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Glucose                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Fructose                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Mannose                            | -          | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Sorbose                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Rhamnose                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Dulcitol                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Inositol                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Mannitol                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   |
| Sorbitol                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Methyl- $\alpha$ ,D-Mannopyranside | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Methyl- $\alpha$ ,D-Glucoside      | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| N-Acethyl-Glucosamine              | +          | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | +   | +   | -   | -   |
| Amygdalin                          | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   |
| Arbutin                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   |
| Esculin                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Salicin                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Cellobiose                         | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   |
| Maltose                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Lactose                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Melibiose                          | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Sucrose                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Trehalose                          | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Inulin                             | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Melezitose                         | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Raffinose                          | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   |
| Starch                             | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Glycogen                           | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Xylitol                            | -          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Gentiobiose                        | -          | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

Table 2. continued

|                    |                           |                           |                           |                   |              |              |                            |              |                           |                            |               |              |               |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|--------------|--------------|----------------------------|--------------|---------------------------|----------------------------|---------------|--------------|---------------|
| D-Turanose         | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | +                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| D-Lyxose           | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| D-Tagatose         | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| D-Fucose           | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| L-Fucose           | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | +                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| D-Arabitol         | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| L-Arabitol         | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| Gluconate          | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | +                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| 2-keto-Gluconate   | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| 5-keto-Gluconate   | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| L-Arginine         | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| L-Lysine           | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| L-Ornithine        | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| Trisodium citrate  | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| Sodium thiosulfate | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| Urea               | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | +                          | +             | -            | -             |
| L-Tryptophan (TDA) | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| L-Tryptophan (IND) | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| Sodium pyruvate    | +                         | +                         | +                         | +                 | +            | +            | +                          | +            | +                         | +                          | +             | +            | +             |
| Gelatin            | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | +                          | +             | -            | -             |
| Nitrate            | -                         | -                         | -                         | -                 | -            | -            | -                          | -            | -                         | -                          | -             | -            | -             |
| API 50CHB          | BNR <sup>1</sup>          | BNR                       | BNR                       | BBNR <sup>2</sup> | BBNR         | BBNR         | <i>P. lau</i> <sup>3</sup> | BBNR         | BNR                       | BBNR                       | BBNR          | BBNR         | BBNR          |
| Identity (%)       | 78.9                      | 78.9                      | 87.5                      | 56.3              | 56.3         | 56.3         | 91.5                       | 56.3         | 65.7                      | 81.8                       | 60.6          | 56.3         | 56.3          |
| 16S rRNA           | <i>L. fu</i> <sup>4</sup> | <i>L. xy</i> <sup>5</sup> | <i>B. fu</i> <sup>6</sup> | <i>L. xy</i>      | <i>L. xy</i> | <i>L. xy</i> | <i>P. fa</i> <sup>7</sup>  | <i>L. xy</i> | <i>L. ma</i> <sup>8</sup> | <i>L. sph</i> <sup>9</sup> | <i>L. sph</i> | <i>L. xy</i> | <i>L. sph</i> |
| Identity (%)       | 99.54                     | 98.36                     | 99.61                     | 98.69             | 98.32        | 98.28        | 99.14                      | 98.22        | 99.33                     | 99.74                      | 99.53         | 98.88        | 99.07         |

<sup>1</sup>BNR, *Bacillus non-reactive*; <sup>2</sup>BBNR, *Brevibacillus non-reactive*; <sup>3</sup>*P. lau*, *Paenibacillus lautus*; <sup>4</sup>*L. fu*, *Lysinibacillus fusiformis*; <sup>5</sup>*L. xy*, *Lysinibacillus xylanilyticus*; <sup>6</sup>*B. fu*, *Bacillus fusiformis*; <sup>7</sup>*P. fa*, *Paenibacillus favisporus*; <sup>8</sup>*L. ma*, *Lysinibacillus macroides*; <sup>9</sup>*L. sph*, *Lysinibacillus sphaericus*.

carboxylase에 관한 연구보고는 국내외적으로 없는 실정이다. 분리 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정하기 위하여 Dunbar et al. (2000)이 제안한 universal primer set (27F와 1492R)을 사용하여 PCR assay를 한 결과, 모든 균주에서 약 1,500 bp 전후의 DNA 증폭 산물을 얻을 수 있었다. 16S rRNA 유전자 염기서열 결과를 NCBI의 BLAST를 통하여 상동성을 검색한 결과, 1균주의 *Lysinibacillus fusiformis* (99.54%의 상동성, 1번 균주), 6균주의 *Lysinibacillus xylanilyticus* (98.28-98.88%의 상동성, 2, 4, 5, 6, 8 및 12번 균주), 1균주의 *Bacillus fusiformis* (99.61%의 상동성, 3번 균주), 1균주의 *Paenibacillus favisporus* (99.14%의 상동성, 7번 균주), 1균주의 *Lysinibacillus macroides* (99.33%의 상동성, 9번 균주) 및 3균주의 *Lysinibacillus sphaericus* (99.07-99.74%의 상동성, 10, 11 및 13번 균주)로 동정되었다(Table 2). 또한 생화학적 분석에서 *Staphylococcus caprae*와 94.3%의 상동성을 나타낸 균주에 대

한 16S rRNA 유전자 염기서열 결과는 *Staphylococcus caprae*와 99.01%의 상동성이 있는 것으로 동정되었다(결과 미제시). 생화학적 및 유전학적 특성에 의한 14균주의 동정 결과, 시판 카나리액젓에서 putrescine을 생성하는 우점종은 *Lysinibacillus xylanilyticus* 및 *Lysinibacillus sphaericus*를 포함한 *Lysinibacillus* 속으로 확인되었다. 카나리액젓에서 분리한 14균주를 대상으로 biogenic amines 생성능 및 병원성 유전자 보유성에 관한 기존의 연구자료를 검색한 결과 전혀 검색되지 않았다. 다만 *Paenibacillus* 속의 *Paenibacillus tyraminigenes*는 멸치젓에서 분리한 균주로 tyramine 생성능이 우수한 것으로 보고되어 있다(Mah et al., 2008). 멸치젓의 경우 발효 초기에는 *Staphylococcus* 속이 주종을 이루나 biogenic amines 생성능은 매우 약한 반면, 발효 기간이 길어지면 *Bacillus* 속이 biogenic amines 생성에 관여하는 주종인 것으로 보고되어 있으며(Mah et al., 2003), 멸치젓에서 가장 우점종의 세균은 *Bacillus* 속이며 새우

것에서의 우점종은 *Staphylococcus* 속인 것으로 보고되어 있다(Guan et al., 2011). 최근 Moon et al. (2013)은 멸치 및 까나리액젓에서 히스타민 생성균 *Bacillus licheniformis* A7 및 *B. coagulans* SL5를 분리하였다는 보고는 있으나, 까나리액젓에서 putrescine 생성균의 분리 및 동정에 관한 연구는 아직 없는 실정이다.

### Putrescine 생성 균주의 효소 활성 검토

Biogenic amines은 단백질을 함유한 식품에서 미생물이 생산하는 탈탄산효소의 작용에 의해 생성되기 때문에 탈탄산효소를 포함한 기타 효소 활성의 검토는 분리 균주의 효소학적 특성을 파악하는데 중요하다. 또한 본 연구에서 분리한 종(Species)에 대한 효소 활성의 연구가 전무하다는 점도 검토의 필요성으로 대두되었다. 따라서 putrescine을 생산하는 14균주가 보유하는 효소 활성은 API ZYM kit를 사용하여 검토하였다. 19종류 모든 효소에 활성이 없는 균주는 5균주(2, 3, 5, 9 및 C1균주)로 확인되었으며, 나머지 9균주의 효소 활성은 2-3종류의 효소에 국한된 것으로 확인되었다(Table 3). Esterase lipase (C8)는 9균주에서 효소 활성을 나타내고 있으나 활성은 약 5 nmol 정도로 낮은 편이었다. Esterase (C4)도 8균주에서 활성이 있

으나 약 5 nmol 정도로 낮았으며,  $\alpha$ -chymotrypsin은 4균주에서, acid phosphatase는 3균주에서,  $\beta$ -glucuronidase는 1균주에서 활성을 나타내었다(Table 3). 결과적으로 효소 활성을 나타내는 9균주의 효소 활성 결과를 보고되어 있는 두 종류의 유산균 즉, *Pediococcus pentosaceus* SH-10 (Shin et al., 2012) 및 *Lactobacillus salivarius* CPM-7 (Lim et al., 2007)와 비교해 보면 활성을 나타내는 효소 종류가 적고 효소 활성도 두 유산균에 비해 현저하게 낮은 것으로 파악되었는데, 이는 비교 대상의 균주들은 속(Genus)이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

### 분리 균주의 putrescine 생성량 측정

Putrescine 표준 물질의 농도에 따른 검량선은  $R^2$ 값이 0.9984로 거의 직선을 나타내었고, retention time (RT)은 21.32분에서 분리된 단일 피크를 확인하였다(Fig. 1A and 1B). Putrescine 생성 균주로 분리한 14균주를 L-ornithine이 0.5% 첨가된 LB broth (NaCl 3%) 5 mL에 24시간 및 48시간 배양 후 배지에 존재하는 putrescine 생성량은 HPLC로 측정하였다(Table 4). 24시간 배양 후 배지에 생성된 putrescine량은 0.01-22.13 mg/L로 균주에 따라 putrescine 생성량의 차이는 크게 나타났다. 또한 48시간 배양한 배양액에 생성된 putrescine량은 1.66-

Table 3. Enzymatic activities of putrescine producing bacteria by API ZYM analysis

| Enzyme                             | Strain No. |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |
|------------------------------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
|                                    | 1          | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | C1 |
| Control                            | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Alkaline phosphate                 | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Esterase (C4)                      | 1          | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1  | 0  | 1  | 1  | 0  |
| Esterase Lipase (C8)               | 1          | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  |
| Lipase (C14)                       | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Leucine arylamidase                | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Valine arylamidase                 | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Crystine arylamidase               | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Trypsin                            | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| $\alpha$ -chymotrypsin             | 2          | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| Acid phosphatase                   | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  |
| Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase    | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| $\alpha$ -galactosidase            | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| $\beta$ -glucuronidase             | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| $\beta$ -glucosidase               | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| $\alpha$ -glucosidase              | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| $\beta$ -glucosidase               | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| $\alpha$ -mannosidase              | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| $\alpha$ -fucosidase               | 0          | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

<sup>0</sup>0, 0 nmol; 1, 5 nmol; 2, 10 nmol,

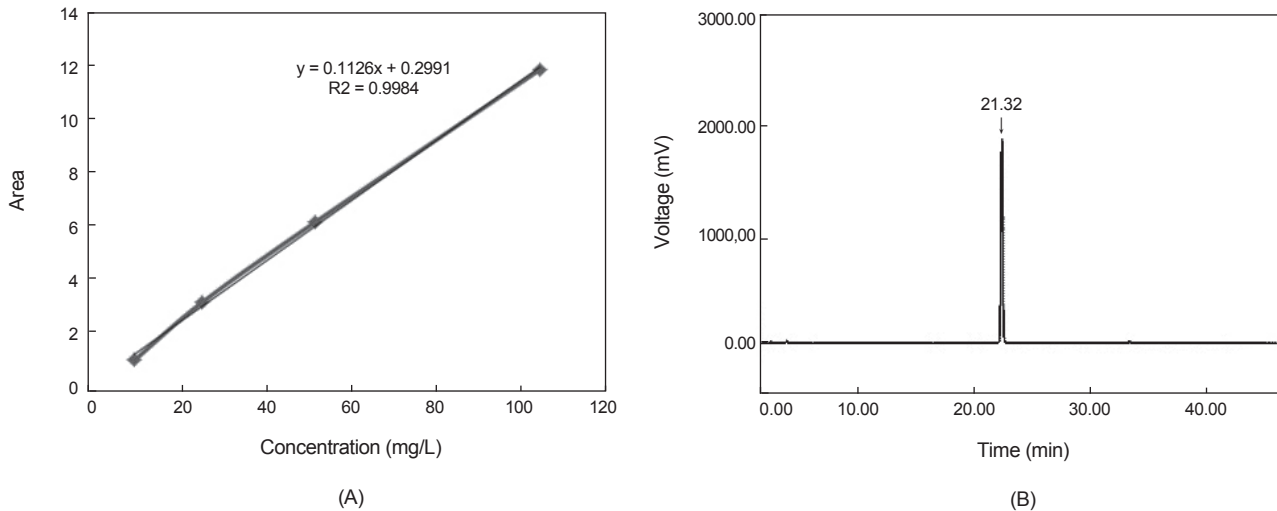


Fig. 1. Calibration curve for concentrated of putrescine (A) and HPLC chromatograms of putrescine (B).

Table 4. Production of putrescine of putrescine-producing bacteria in LB broth by incubation time

| Strain No. | Concentration of putrescine (mg/L) |        |
|------------|------------------------------------|--------|
|            | 24 h                               | 48 h   |
| 1          | 17.58                              | 31.14  |
| 2          | 7.92                               | 13.97  |
| 3          | 4.51                               | 7.28   |
| 4          | 15.02                              | 33.44  |
| 5          | 9.31                               | 13.43  |
| 6          | 15.59                              | 26.36  |
| 7          | 0.01                               | 1.66   |
| 8          | 14.92                              | 27.88  |
| 9          | 4.61                               | 8.14   |
| 10         | 10.30                              | 14.00  |
| 11         | 15.22                              | 16.48  |
| 12         | 11.75                              | 27.96  |
| 13         | 22.13                              | 28.57  |
| C1         | 0.02                               | 236.97 |

236.97 mg/L로 24시간에 비해서는 월등하게 많은 양이 검출되었다. 48시간 배양했음에도 불구하고 일부 균주(3번, 7번 및 9번)는 10.0 mg/L 이하로 매우 소량의 putrescine이 검출되었는데 이는 탈탄산효소유전자에 문제가 있거나, 사용한 배지가 putrescine 생성에 적절하지 못한 배지였거나 또는 putrescine 생성균이 아닐 가능성도 충분히 있다고 판단된다. Putrescine 생성능이 가장 우수한 균주는 그람 양성 균인 *Staphylococcus capitis* C1균주이었으며 가장 활성이 좋은 다른 균주와 비교해

도 약 7.1배 높은 것으로 확인되었으며, *Staphylococcus capitis* C1균주 이외의 다른 13균주의 putrescine 생성량은 1.66-33.44 mg/L 범위로 대체로 낮게 측정되었다. 까나리액젓을 포함한 액젓 유래 세균의 putrescine 생성량에 관한 기존의 연구결과가 없기 때문에 비교할 수는 없지만 멸치액젓 및 까나리액젓에서 분리한 histamine 생성 균주인 *B. licheniformis* A7 및 *B. coagulans* SL5의 경우 histamine의 최대생성량이  $22.3 \pm 3.5$  및  $15.1 \pm 1.5$  mg/L였다는 결과(Moon et al., 2013)와 비교해 보면 본 연구에서 사용한 13균주의 putrescine 평균 생성량은 19.25 mg/L로 기존의 보고와 큰 차이는 없었으나 균주에 따른 생성량의 차이는 크게 나타났다. Biogenic amines은 단백질을 함유한 식품이 부패하거나 발효 또는 숙성과정에서 유리아미노산이 탈탄산효소를 생산하는 미생물에 의해 생성되는 저분자의 질소화합물로 *Bacillus* spp, *Citrobacter* spp, *Clostridium* spp, *Escherichia* spp, *Lactobacillus* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp, *Pediococcus* spp, *Streptococcus* spp, 및 *Enterococcus* spp. 등 그람 양성 및 음성균에 의해 만들어진다 (Halász et al., 1994; Burdychova and komprda, 2007; Landete et al., 2007). 현재 biogenic amines에 관한 국내·외 연구는 멸치액젓, 간장, 된장, 청국장, 김치, 와인, 치즈, 소시지 등에서 연구가 많이 진행되어 왔지만 까나리액젓에 관한 연구는 매우 미비한 상태이다. 우리나라는 김치, 반찬, 국에도 액젓을 자주 사용하여 수요량이 점점 증가하고 있는 추세이기 때문에 과거에 비해 biogenic amines에 노출 위험성이 증가하고 있다는 점에서 액젓 및 발효식품의 안정성을 제고하는 많은 연구가 절실하게 필요하다. 따라서 biogenic amines 중 직접적인 독성을 나타내는 histamine과 tyramine 뿐만 아니라 이들의 독성을 증강시키는 putrescine 및 다른 biogenic amines에 관한 연구도 함께 진행되어야 한다고 판단된다.

## 사 사

이 논문은 2016년도 호남씨그램트센터 연구개발사업(국내 시판용 까나리액젓의 바이오제닉아민 정량 및 생성균의 분리 및 동정) 과제지원으로 수행된 연구임.

## References

- Biji KB, Ravishankar CN, Venkateswarlu R, Mohan CO and Gopal TK. 2016. Biogenic amines in seafood: a review. *J Food Sci Technol* 53, 2210-2218. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-016-2224-x>.
- Bills DD, Hildrum KI, Scanlan RA and Libbey LM. 1973. Potential precursors of N-nitrosopyrrolidine in bacon and other fried foods. *J Agric Food Chem* 21, 876-877.
- Burdychova R and Komprda T. 2007. Biogenic amine forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol Lett* 276, 149-155. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x>.
- Dunbar J, Ticknor LO and Kuske CR. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl Environ Microbiol* 66, 2943-2950. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.7.2943-2950.2000>.
- Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH and Wymenga W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int J Food Microbiol* 57, 107-114. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00238-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00238-5).
- Guan L, Cho KH and Lee JH. 2011. Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiol* 28, 101-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.001>.
- Halász A, Baráth A, Simon-Sarkadi L and Holzapfel W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol* 5, 42-48.
- Health Canada's Maximum Levels for Chemical Contaminants in Foods. 2016. Health Canada. Ottawa, Canada. Retrieved from <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/contaminants-guidelines-directives-eng.php>. on 18 October.
- Jeong DW, Han S and Lee JH. 2014. Safety and technological characterization of *Staphylococcus equorum* isolates from jeotgal, a Korean high-salt-fermented seafood, for starter development. *Int J Food Microbiol* 188, 108-115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.022>.
- Kim B, Byun BY and Mah JH. 2012. Biogenic amine formation and bacterial contribution in Natto products. *Food Chem* 135, 2005-2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.091>.
- Kim JH, Ahn HJ, Jo C, Park HJ, Chung YJ and Byun MW. 2004. Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. *Food Control* 15, 405-408. [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00102-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00102-6).
- KMFDS (Korea Ministry of Food and Drug Safety). 2016. Korean Food Code. KMFDS, Cheongju, Korea. Retrieved from <http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/food/foodRvlv/foodRvlv.do>. on 18 August.
- Landete JM, de Las Rivas B, Marcobal A and Muñoz R. 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Int J Food Microbiol* 117, 258-269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001>.
- Lim SJ, Jang SS and Kang DK. 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* CPM-7 isolated from chicken feces. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35, 98-103.
- Mah JH, Ahn JB, Park JH, Sung HC and Hwang HJ. 2003. Characterization of biogenic amine producing microorganisms isolated from Myeolchi-Jeot, Korean salted and fermented anchovy. *J Microbiol Biotechnol* 13, 692-699.
- Mah JH, Chang YH and Hwang HJ. 2008. *Paenibacillus tyraminigenes* sp. nov. isolated from Myeolchi-jeotgal, a traditional Korean salted and fermented anchovy. *Int J Food Microbiol* 127, 209-214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.002>.
- Moon JS, Kim SY, Cho KJ, Yang SJ, Yoon GM, Eom HJ and Han NS. 2013. Isolation and characterization of histamine-producing bacteria from fermented fish products. *J Microbiol* 51, 881-885. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-013-3333-0>.
- NFQS (National Fishery Products Quality Management Service). 2016. Busan, Korea. Retrieved from [http://www.nfqs.go.kr/2013/contents.asp?m=5&s=1&s2=2&fnm=su\\_b\\_5\\_1\\_2\\_a&id=2371&gubun=05&currPage=1&searchFlag=N&sortWhat=EDATE&sortHow=DESC&stat\\_gubun=00&sItem=&sStr=](http://www.nfqs.go.kr/2013/contents.asp?m=5&s=1&s2=2&fnm=su_b_5_1_2_a&id=2371&gubun=05&currPage=1&searchFlag=N&sortWhat=EDATE&sortHow=DESC&stat_gubun=00&sItem=&sStr=). on 18 August.
- Prester L. 2011. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28, 1547-1560. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.600728>.
- Shin DM, Kim HD, Koo JG and Park KS. 2012. Inhibition of pathogenic bacteria by *Pediococcus pentosaceus* strain SH-10 isolated from hard clam *Meretrix meretrix* Sikhae. *Korean J Fish Aquat Sci* 45, 600-605. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0414>.
- ten Brink B, Minekus M, van der Vossen JM, Leer RJ and Huis in't Veld JH. 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J Appl Bacteriol* 77, 140-148.
- Udomsil N, Rodtong S, Tanasupawat S and Yongsawatdigul J. 2015. Improvement of Fish Sauce Quality by Strain CMC5-3-1: A Novel Species of *Staphylococcus* sp. *J Food Sci* 80, 2015-2022. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12986>.
- Um IS and Park KS. 2015. Biogenic amine contents of com-



- mercial salted and fermented sand lance, *Ammodytes personatus*, sauces. Korean J Fish Aquat Sci 48, 883-887. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0883>.
- USFDA (US Food and Drug Administration). 2011. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. Fourth Edition. Chapter 7. Scombrototoxin (histamine) formation, 113-152.
- Vandenesch F, Eykyn SJ, Bes M, Meugnier H, Fleurette J and Etienne J. 1995. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates isolated as human pathogens and from goat milk. J Clin Microbil 33, 888-892.
- Wathersen JJ, Scanlan RA, Bills DD and Libbey LM. 1975. Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. J Agric Food Chem 23, 898-902.
- Yang J, Ding X, Qin Y and Zeng Y. 2014. Safety Assessment of the Biogenic Amines in Fermented Soya Beans and Fermented Bean Curd. J Agric Food Chem 62, 7947-7954. <http://dx.doi.org/10.1021/jf501772s>.
- Yongsawatdigul J, Rodtong S and Raksakulthai N. 2007. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. J Foog Sci 72, 382-390.
- Zaman MZ, Abu Baker F, Jinap S and Bakar J. 2011. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. Int J Food Microbiol 145, 84-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031>.
- Zheng B, Jiang X, Li A, Yao J, Zhang J, Hu X and Li L. 2015. Whole-genome sequence of multidrug-resistant *Staphylococcus caprae* strain 9557, isolated from cerebrospinal fluid. Genome Announc 3, pii: e00718-15. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00718-15>.
- Zhou X, Qiu M, Zhao D, Lu F and Ding Y. 2016. Inhibitory effects of spices on biogenic amine accumulation during fish sauce fermentation. J Food Sci 81, 913-920. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13255>.